



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06319396 A**(43) Date of publication of application: **22.11.94**

(51) Int. Cl

**A01H 5/00
C12N 15/13
C12P 21/08**(21) Application number: **05131208**(22) Date of filing: **07.05.93**(71) Applicant: **JAPAN TOBACCO INC KURARAY
CO LTD**(72) Inventor: **SAITO YASUTO
KOGIKU TOSHIHIKO
KAMISHIRO TAKASHI
MURAFUJI HITOAKI
TAKAMI MASAOKI
FUMINO MASAYASU**

(54) **PLANT FOR PRODUCTION ANTIVIRAL
ANTIBODY AND METHOD FOR CREATING THE
SAME PLANT**

(57) Abstract:

PURPOSE: To provide a plant for producing antiviral antibody and a method for creating the plant.

CONSTITUTION: The plant produces antiviral monoclonal antibody derived from animals including human. The method for creating this plant contains a step for

establishing a hybridoma producing monoclonal antibody to desired virus, a step for preparing cDNA from the hybridoma, a step for selecting cDNA coding H chain and L chain of the monoclonal antibody from the cDNA, a step for integrating the cDNA into a plant expression vector, a step for transforming a desired plant with the plant expression vector and a step for selecting the plant producing desired antibody from the plant after transforming step.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-319396

(43)公開日 平成 6 年(1994)11月22日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 0 1 H 5/00	Z N A A	8502-2B		
C 1 2 N 15/13				
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
審査請求 未請求 請求項の数 8 F D (全 26 頁)				

(21)出願番号 特願平5-131208

(22)出願日 平成 5 年(1993) 5 月 7 日

(71)出願人 000004569

日本たばこ産業株式会社
東京都品川区東品川 4 丁目12番62号

(71)出願人 000001085

株式会社クラレ
岡山県倉敷市酒津1621番地

(72)発明者 斎藤 靖人

静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ
産業株式会社遺伝育種研究所内

(72)発明者 小鞠 敏彦

静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ
産業株式会社遺伝育種研究所内

(74)代理人 弁理士 谷川 英次郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗ウイルス抗体を産生する植物及びその作出方法

(57)【要約】

【目的】 抗ウイルス抗体を産生する植物及びその作出方法を提供すること。

【構成】 動物（ヒトを含む）由来の抗ウイルスモノクローナル抗体を産生する植物を提供する。また、本発明は、所望のウイルスに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立する工程と、該ハイブリドーマから c D N A を調製する工程と、該 c D N A から、前記モノクローナル抗体の H 鎖及び L 鎖をコードする c D N A を選択する工程と、該 c D N A を植物発現ベクターに組み込む工程と、該植物発現ベクターで所望の植物を形質転換する工程と、形質転換工程後の植物から所望の抗体を産生する植物を選択する工程を含む、上記本発明の植物の作出方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 動物由来の抗ウイルスモノクローナル抗体を産生する植物。

【請求項2】 前記ウイルスはタバコモザイクウイルスである請求項1記載の植物。

【請求項3】 タバコである請求項1又は2記載の植物。

【請求項4】 所望のウイルスに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立する工程と、該ハイブリドーマからcDNAを調製する工程と、該cDNAから、前記モノクローナル抗体のH鎖及びL鎖をコードするcDNAを選択する工程と、該cDNAを植物発現ベクターに組み込む工程と、該植物発現ベクターで所望の植物を形質転換する工程と、形質転換工程後の植物から所望の抗体を産生する植物を選択する工程を含む、請求項1記載の植物の作出方法。

【請求項5】 前記ウイルスはタバコモザイクウイルスである請求項4記載の方法。

【請求項6】 前記植物はタバコである請求項4又は5記載の方法。

【請求項7】 前記植物発現ベクターはTiプラスミド系のベクターであり、前記形質転換工程は、Tiプラスミド系組換えベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンシスに組み込み、次いで該アグロバクテリウム・ツメファシエンシスを植物に感染させることにより行われる請求項4ないし6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 前記H鎖及びL鎖をコードするcDNAは、それぞれのリーダー配列を有する請求項4ないし7のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、抗ウイルス抗体を産生する植物及びその作出方法に関する。本発明は抗体の工業的生産及び耐ウイルス植物の作出に有用である。

【0002】

【従来の技術】現在、抗ウイルスモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法により生産されている。すなわち、動物をウイルスで免疫し、この動物からの抗体産生細胞と骨髓腫細胞との間に融合細胞ハイブリッド（ハイブリドーマ）を形成させ、これをクローン化する。次いで上記ウイルスに対し特異性を示す抗体を産生するクローンを選択し、培養を行って上記ウイルスに対するモノクローナル抗体を得る。

【0003】しかしながら、このハイブリドーマ法を用いた抗ウイルス抗体の製造方法は時間とコストがかかる。

【0004】一方、Andrew Hiatt et al., Nature, 342 (1988) 76-78 "Production of antibodies in transgenic plants"には、低分子のリン酸エステル（P3）に結合し、カルボン酸エステルの加水分解を触媒する6D4

という抗体に対する遺伝子をタバコに導入したことが記載されている。6D4抗体のH鎖（heavy chain）及びL鎖（light chain）遺伝子それぞれについてリーダー配列を含むもの、欠くものの、合計4種類の遺伝子をアグロバクテリウムを用いてタバコに導入した。H鎖、L鎖を生産している形質転換体で交配を行うことにより両鎖のタンパクを結合させた。結合には、リーダー配列が必要であった。この結果、葉の全可溶性タンパクの1.3%にあたる抗体が形質転換体内で生成された。形質転換体内で生成される抗体と抗原であるP3との結合はハイブリドーマ由来の抗体と同様、特異的であった。

【0005】しかしながら、この方法では、交配することによって抗体を生成している形質転換体を得るため、時間と労力がかかる。また、抗原はウイルスではない。ウイルスのような高分子成分を抗原にした場合、活性部位の立体構造が植物細胞中で動物と同様に組み立てられるか問題がある。

【0006】また、Klaus Düringら、Plant Molecular Biology, 15(1990)281-293 "Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*"には、B1-8抗体に対する遺伝子を導入したタバコが記載されている。B1-8抗体のH鎖及びL鎖遺伝子に大麦アリューロン層 α -アミラーゼのシグナル配列を接続し、両鎖遺伝子を連結させアグロバクテリウムを用いてタバコに導入した。形質転換体で両鎖が結合し、活性のあるB1-8抗体が生成された。電子顕微鏡観察を行ったところ、小胞体のみならず葉緑体においても抗体が存在することが明らかとなった。

【0007】しかしながら、この論文には、生成された抗体の生成量については詳しく報告されておらず、抗体の生成量は上記Hiattらの交配法に比較して低いと考えられる。また、植物体で生成された抗体は抗ウイルス抗体ではない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】上述のように、ハイブリドーマ法による抗ウイルス抗体の製造は時間とコストがかかる。また、従来、植物に抗ウイルス抗体を産生させた例はない。従って、本発明の目的は、抗ウイルス抗体を産生する植物及びその作出方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、鋭意研究の結果、抗ウイルス抗体を産生するハイブリドーマのcDNAを含むベクターで植物を形質転換することにより、抗ウイルス抗体を産生する植物を作出することに成功し、本願発明を完成した。

【0010】すなわち、本発明は、動物（ヒトを含む）由来の抗ウイルスモノクローナル抗体を産生する植物を提供する。また、本発明は、所望のウイルスに対するモ

ノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立する工程と、該ハイブリドーマからcDNAを調製する工程と、該cDNAから、前記モノクローナル抗体のH鎖及びL鎖をコードするcDNAを選択する工程と、該cDNAを植物発現ベクターに組み込む工程と、該植物発現ベクターで所望の植物を形質転換する工程と、形質転換工程後の植物から所望の抗体を産生する植物を選択する工程を含む、上記本発明の植物の作出方法を提供する。

【0011】以下、本発明を詳細に説明する。

【0012】本発明の植物は、動物由来の抗ウイルスモノクローナル抗体を産生するものである。植物は、下記実施例においてはタバコを用いたが、これに限定されるものではない。また、モノクローナル抗体は、下記実施例ではマウス由来のものであるが、ヒト、ウシ、ブタ、ヒツジ、サル、イヌ、ネコ等の他の哺乳動物由来のものやニワトリ等の鳥類由来のものであってもよい。また、ウイルスは、下記実施例ではタバコモザイクウイルス(TMV)を用いたが、これに限定されるものではなく、抗体が医薬、動物用薬、診断薬等として有用ないずれのウイルス又は植物がそれに対する抵抗性を持つことが望まれるいずれのウイルスであってもよい。

【0013】本発明の植物は、次の方法により作出することができる。

【0014】まず、所望のウイルスに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立する。これは常法であるハイブリドーマ法により行うことができ、その操作の1例の詳細は下記実施例に記載されている。なお、下記実施例では、後の工程で得られたcDNAが該モノクローナル抗体をコードするものであることを確認するために、該モノクローナル抗体を精製し、そのアミノ酸配列を部分的に同定した。

【0015】次いで、該ハイブリドーマからcDNAを調製する。cDNAの調製は、ハイブリドーマから全mRNAを常法により回収し、これを鋳型として逆転写酵素を作用させて行うことができる。cDNAは、常法により、大腸菌等を宿主として用いたcDNAライブラリーに調製することができる。さらに、下記実施例では、全mRNAをショ糖密度勾配遠心にかけ、H鎖遺伝子のmRNA分画(以下、H-mRNAということがある)と、L鎖遺伝子のmRNA分画(以下、L-mRNAということがある)とを得、それぞれ公知の定常領域の配列を有するオリゴプライマーを用いて逆転写を行い、cDNAを作製した。これらのcDNAは、次の工程で上記cDNAライブラリーからH鎖及びL鎖をコードするcDNAを選択するためのプローブとして用いた。

【0016】次いで、上記cDNAライブラリーから、上記モノクローナル抗体のH鎖及びL鎖をコードするcDNAを選択する。これは、上記H-mRNA及びL-mRNAからそれぞれ調製した一本鎖cDNAをプローブとして用いたコロニーハイブリダイゼーションにより

行うことができる。この操作の詳細は下記実施例に記載されている。選択したコロニーよりラピッドプラスミド単離法(rapid plasmid isolation法)等によりプラスミドを得、それからPst Iのような適当な制限酵素により挿入断片を切り出し、ゲル電気泳動等によりその長さを検定し、目的に合う長さの断片を持つコロニーをさらに選別することができる。この挿入断片について、文献既知の定常領域をプローブとするサザン・ハイブリダイゼーションを行い、免疫グロブリンcDNAを持つクローンを選定することができる。さらに、念を入れるならば、上記挿入断片を各種制限酵素で消化し、その切断パターンを文献記載のL鎖及びH鎖の定常領域のそれと比較して免疫グロブリンcDNAクローンの同定を行うことができる。下記実施例ではさらに、このようにして選択されたH鎖コードcDNA及びL鎖コードcDNAの塩基配列をマキサム・ギルバート法(Maxam & Gilbert法)により決定した。

【0017】次いで、H鎖及びL鎖をそれぞれコードするcDNAを植物ベクターに組み込む。遺伝子の植物細胞への導入は完成されたベクター系を用いることが好ましく、現在のところTiプラスミドを用いる系が最良である。なお、Tiプラスミド系ベクターは、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)に含まれるTiプラスミド中の左右ボーダー領域を有するものが、強力な植物形質転換能力を有することを利用したベクターである。Tiプラスミド系に組み込むために、cDNA断片の5'上流非翻訳部分において、ATGの上流(例えば10~30bps上流)にTiベクターに組み込むための制限酵素リンカーを付加し、一方、終止コドンの3'下流非翻訳部分において終止コドンとポリA部分との間にも同じ制限酵素リンカーを付加することが好ましい。このようにすれば、リンカーとして導入した制限酵素部位を切断する制限酵素で、調製したcDNAが1つの断片として切り出され、それをそのままTiプラスミド系に組み込むことができるので好都合である。このようなcDNA断片を、例えば大腸菌ベクター中にクローニングし、大量調製した後、植物ベクターに組み込むことが好ましい。なお、上記制限酵素リンカーに切断部位を有する制限酵素は、H鎖及びL鎖cDNA中に切断部位を持たず、しかもcDNA調製の際に用いるベクター中にクローニング部位以外に切断部位を持たないものを選択する必要がある。なお、用いるクローニングベクターのマルチクローニング部位中の所望の制限酵素部位がない場合には、常法によりこれを導入することができる。下記の実施例では、クローニング用ベクターとして大腸菌ベクターpUC18及びpUC9(Pharmacia PLより市販)を用い、制限酵素リンカーとしてはBgl IIリンカーを用いた(なお、pUC18及びpUC19にはマルチクローニング部位中にBgl II部位がないので、これを導入した)。

【0018】次いで、クローニングしたH鎖及びL鎖cDNA断片を、Tiプラスミド系の上記のような植物ベクターに組み込む。この操作は、上記制限酵素リンカーに切断部位を有する制限酵素でcDNA断片を切り出し、同じ制限酵素で植物ベクターを切断してcDNA断片を植物ベクター中に組み込むことによって行うことができる。H鎖cDNAとL鎖cDNAとは別々のベクターに入っているが、同一のベクター中に入っていると操作が簡便になるので、下記実施例では後者を採用した。これは、例えば、H鎖cDNAを含む組換えベクターと、L鎖cDNAを含む組換えベクターを上記方法でまず作製し、次いで、これらを組み替えることにより行うことができる。

【0019】植物ベクターとしてTiプラスミド系を用いた場合、これで植物を形質転換するためには、上記組換えベクターを凍結法等により、先ず、アグロバクテリウム・ツメファシエンシスに導入し、これを植物に感染させることにより行う。植物への感染は、液体培地中で植物断片（例えば葉片）と上記組換えTiプラスミドベクター含有アグロバクテリウム・ツメファシエンシスを共存培養することにより行うことができる。次いで、植物断片を茎葉分化培地で培養し、次いで発根培地で培養することにより、形質転換された植物体を得ることができる。

【0020】次いで、得られた植物から所望の抗体を産生する植物を選択する。これは、ELISAのような免疫分析により、抗原ウイルスと特異的に反応する抗体が産生されているか否かを調べることにより行うことができる。選択の効率を高めるため、これに先立ち、例えば、植物細胞からmRNAを抽出し、常法であるノーザン分析により抗体のmRNAを産生している植物を選択し、さらに、ウェスタン分析でH鎖及びL鎖の発現を確認することが好ましい。さらには、Protein Aのような抗体の定常領域に特異的に結合する物質を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより得られたものをウェスタン分析することにより、両鎖の会合を確認することができる。

【0021】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきさらに具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0022】1. 抗TMVモノクローナル抗体の作製 1-1

マウスをTMV又はTMVのコートタンパク（CP）で免疫した。免疫は $50\mu\text{g}/1$ 回の投与量で2～3回行った。最終免疫3日後にマウスから脾細胞を取り出した。マウスミエローマ細胞（P3-X63-Ag-U1（P3-U1）、P3-N SI/1-Ag4-1（NS-1）及びX63-Ag8-6.5.3（Ag 8-6.5.3））2～

10×10^7 個と免疫したマウスから取り出した脾細胞（ $1\sim 3\times 10^8$ 個）をRPMI1640培地で洗浄後混合した。50%PEG4000溶液（RPMI1640培地に溶かす）を1分間かけて滴下し、1分間攪拌後RPMI1640培地10mlで徐々に希釈した。遠心後HAT培地（RPMI1640培地、FCS 10%、ヒポキサンチン 10^{-4}M 、チミジン $1.6\times 10^{-5}\text{M}$ 、アミノプテリン $4\times 10^{-7}\text{M}$ ）に懸濁し、96穴プレートに $1\sim 5\times 10^5$ 個（脾細胞）ずつ分注して培養した。2～4日ごとに培地を交換し、適当な時期にHT培地（RPMI1640培地ヒポキサンチン 10^{-4}M 、チミジン $1.6\times 10^{-5}\text{M}$ ）に切り換えた。増殖の認められたウエルはRIAあるいはELISAでTMV（又はCP）を抗原としてスクリーニングを行った。すなわち、TMVあるいはCPを含むPBS（ $10\mu\text{g/ml}$ 、 0.15M NaCl、 10mM リン酸緩衝液、pH 7.5） $50\mu\text{l}$ をマイクロタイタープレートに入れ抗原を吸着させ、ブロック処理後、適当に希釈した培養上清と反応させた。洗浄後ペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG（HRP-抗マウスIgG）溶液と反応させ、オーフェニレンジアミンと過酸化水素を基質として発色させ、 492nm の吸光度を測定した。得られた抗体のサブクラスは、ELISAとオクタルロニーにより決定した。

【0023】1-2

上記操作により、 $100\sim 300$ 個のハイブリドーマが1回の融合で得られ、このうち抗TMV又は抗TMVCPに特異的なモノクローナル抗体を産生するものは $10\sim 30\%$ であった。これらのうち、6ヶ月以上の継代培養でも抗体生産能は低下しない、安定なハイブリドーマであるハイブリドーマP-7を以下の操作に用いた。ハイブリドーマP-7が産生するモノクローナル抗体P-7のサブクラスはIgG₁であった。

【0024】1-3

P-7モノクローナル抗体の精製及びアミノ酸シーケンス

①図1に示す方法によりP-7モノクローナル抗体を精製した。この方法により、FCS由来のウシIgGがほぼ完全に除去されたP-7モノクローナル抗体を調製することができた。

【0025】② P-7MabのH鎖、L鎖に対して作製したcDNA（H-cDNA、L-cDNA）を蛋白質レベルで同定するために、精製したP-7Mabを用いて、H鎖とL鎖の分離並びにN末のアミノ酸シーケンスの決定を試みた。H鎖とL鎖の分離は図2に示す方法により行った。L鎖に関しては、SDS-PAGE後ゲルから抽出し、HPLCで精製することによりアミノ酸シーケンサーにかけることができた。この結果、N末から14番目までがcDNAからの推定アミノ酸と一致した（表1）。

【0026】

【表1】

アミノ酸No.	1	2	3	4	5	6	7
アミノ酸シーケンサー	Asp	ILe	Val	Met	Thr	Glu 又は Gln	Ala
cDNAからの 推定アミノ酸	Asp	ILe	Val	Met	Thr	Gln	Ala
アミノ酸No.	8	9	10	11	12	13	14
アミノ酸シーケンサー	Ala	Pro	Ser	ILe	Pro	Val	(Thr)
cDNAからの 推定アミノ酸	Ala	Pro	Ser	ILe	Pro	Val	Thr

【0027】なお cDNA の C、J 領域が既報の IgG1 と一致したことを考慮すると、作製した cDNA は、P-7Mab に対応するものと考えられる。

【0028】一方、H鎖は、N末がブロック（ピログルタミン酸）されていたため、L鎖と同じ方法ではアミノ酸列を決定出来なかったため、次に述べる方法で解析した。まず、図2の方法にしたがってH鎖を分離した。

【0029】分離したH鎖は、BrCNで分解し、トリプシン及びV-8で消化を行った後、FAB マススペクトロメ

マススペクトロメトリの解析能力を考えると分子量5万で糖鎖の結合した物質を完全に同定することは不可能であるが、一部のフラグメントを表2に示す。この結果から、H鎖に関してもcDNAと蛋白(P-7Mab)とは対応する可能性がある。より正確には、Fc部分を除去し、分子量を約2～2.5万にし、図2の方法で確認するか、他の方法で解析しなければならない。

【0030】

【表2】

30

フラグメント ⁽¹⁾	分子量	使用した消化酵素 ⁽²⁾	フラグメント ⁽¹⁾	分子量	使用した消化酵素 ⁽²⁾
1- 10 ⁽³⁾	1070	V-8	322-333	1243	TP
68- 74	719	TP	358-367	1122	V-8
82- 89 ⁽³⁾	801	V-8	368-374	868	V-8
183-189	770	V-8	375-379	576	V-8
219-222	484	TP	380-388	1115	V-8
248-257	1100	TP	398-416	2377	V-8
272-282	1370	V-8	430-437	944	V-8
305-308	443	V-8			

(1) 数値はN末端からのアミノ酸番号を示す。(2) TP: トリプシン、V-8: *Staphylococcus aureus* の産生する酵素。(3) 1-10、82-89はN末端がグルタミンになっており、これはエドマン分解でも分解されないことが確認されている。

【0031】2 抗 TMVマウス IgG-cDNA のクローニング

2-1 抗 TMVマウスIgG の mRNA の抽出

抗 TMVマウスIgG 産生ハイブリドーマ P-7の2g 湿潤ペレットよりGTC 法により、全 RNAを抽出した後、oligo-dTセルロースカラムを通すことにより、poly ARNA (=mRNA) を 300 μ g 得た。これを全 mRNA とした。さらに、この一部 109 μ g を5~20%ショ糖密度勾配遠心法により分画した後、それぞれの画分をインビトロトランスレーション(in-vitro translation)により検定した。活性を持つ全mRNAの大半が、L鎖およびH鎖のmRNAに相当する分画にありハイブリドーマ P-7の産生するmRNAのうちかなりの部分が IgG mRNA であると思われる。17Sに相当するFR9~11よりH鎖mRNA (10 μ g) を得、13Sに相当するFr13~15よりL鎖mRNA (7 μ g) を得た。

【0032】2-2 IgG-cDNAライブラリーの作製

鋳型mRNAにDNA合成のプライマーをハイブリダイズさせ、逆転写酵素によりmRNAと相補的な鎖cDNAを合成し、次いで一鎖cDNAと相補的な+鎖cDNAをDNAポリメラーゼを用いて合成し、鋳型mRNAに相補的な二本鎖DNAを合成した。この操作は以下に示すように、Gubler法 (Gene, 25巻、ページ263-269、1983年) により次の3つの場合に分けて行った。

【0033】①全 mRNA 鋳型: oligo-dTプライマー

全mRNA 5 μ g を鋳型、oligo-dT (Pd12-18) をプライマーとして用い、RNase阻害剤 (RNasin) 存在下、AMV 逆転写酵素 (RTase) により mRNA と相補的な一本鎖 cDNA (sscDNA) を mRNA とのハイブリッドで得た。次いでRNaseH, DNA ポリメラーゼ I (Konberg), E.coli DNAリガーゼにより2本鎖 DNA (dscDNA) とした。得られた2本鎖DNAは種々の長さの混合物であるので、セファロー スCL-6Bカラム (ファルマシア社より市販) を通し600bp以下のcDNAを除去した。このdscDNAを pBR322 に組み込むために、ターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼ (terminal deoxynucleotidyl transferase) (TdTase)、dCTPを用いdscDNA の両 3' 末に dC (10-20) を付加したものと、市販されている pBR322 の PstI 部位 3' 末にdG (25) 付加されたもの (Pharmacia PLより市販) をdC-dG アニールンクさせ環状として、E. coli K12 RRI (recA+) を形質転換した。テトラサイクリン耐性のコロニーとしてcDNAライブラリーを得た (5 \times 100,000コロニー/1 μ g cDNA)。

【0034】②L鎖 mRNA 鋳型: 合成オリゴマー 15bs プライマー

ショ糖密度勾配遠心により分画したL鎖 mRNA 5 μ g を鋳型、合成オリゴマー [5'-CCTCCAGATGTTAAC: L鎖定常領域の 5' 側のHpaI部位を含む15bs] をプライマーとして用い、①とまったく同様に行なった。形質転換の効率は5 \times 100,000コロニー/1 μ g cDNAであった。

【0035】③H鎖 mRNA 鋳型: 合成オリゴマー 15bs プライマー

ショ糖密度勾配遠心により分画したH鎖 mRNA 5 μ g を鋳型、合成オリゴマー [5'-AGGGTCACCATGGAG: H鎖定常

11

領域の 5' 側の Nco I 部位を含む 15bs] をプライマーとして用い、①とまったく同様に行なった。形質転換の効率は $3 \times 100,000$ コロニー / $1 \mu\text{g}$ cDNA であった。

【0036】2-3 IgG・cDNA クローンの検索と同定

2-3-1 L鎖 cDNA クローンの検索と同定

1) コロニーハイブリダイゼーションを行なうに当たりまずプローブを作製した。L鎖 mRNA $5 \mu\text{g}$ よりオリゴ dT プライマーを用い、cDNA 作成とまったく同様の方法により sscDNA と mRNA のハイブリッドを得、これを 0.2M NaOH で加水分解して sscDNA を得た。この時塩基に α -32PdCTP, α -32PdATP の 32P ラベルされた塩基を用い、sscDNA を RI ラベルした。

【0037】2) 上記のプローブを用いて、cDNA ライブラリー①及び②それぞれ約 2000 個のコロニーについてコロニーハイブリダイゼーションを行なった。選択したコロニーの個数は全 mRNA からオリゴ dT プライマーを用いて作製した cDNA ライブラリーから 204 個、L鎖 mRNA から合成オリゴマーを用いて作製した cDNA ライブラリーから 33 個であった。

【0038】3) これら選択したコロニーよりラピッドプラスミド単離 (rapid plasmid isolation) 法でプラスミドを調製し、PstI 消化後、1.2 % アガロースゲル電気泳動により切り出される断片の長さを検定し、300 ~ 1200bps の断片をもつクローンを選択した。cDNA ライブラリー①から 30 個、cDNA ライブラリー②から 16 個のクローンを選択した。

【0039】4) 次に PstI で切り出される断片のサザンハイブリダイゼーションを行なった。プローブとして Philip Leder 博士より提供されたマウス emb RI Ck+Jk (Charon 4A ベクター中でクローニング) をニックトランスレーションにより RI ラベルしたものを用了。先程選択した①の 30 個より、長い断片を持つクローン 18 個を選びサザンハイブリダイゼーションを行ない、強くハイブリダイズするクローン 1 個を得た。同様に②の 16 個より 14 個を選び、サザンハイブリダイゼーションをおこない、ハイブリダイズするクローン 3 個を得た。

【0040】5) 得られた各クローンについて大スケールでプラスミドを調製し、各種制限酵素で消化し、その切断パターン (図 3) を文献記載の L鎖定常領域のそれと比較することによって①より得られたクローン EL-39 が IgG L鎖 cDNA の全領域を持つものと同定された。②より得られたクローンについて全領域を持たないことより、以後の検索は行なわなかった。

【0041】2-3-2 H鎖 cDNA クローンの検索と同定

1) L鎖の場合と同様にコロニーハイブリダイゼーションにより可能性のあるクローンを選択した。プローブの作製は、H鎖 mRNA $5 \mu\text{g}$ 、オリゴ dT プライマーを用いて、cDNA 作製および L鎖におけるプローブの作成と同

12

様の方法により、RI ラベルされた sscDNA を調製した。

【0042】2) このプローブを用いて、①および③の cDNA ライブラリーそれぞれ約 2000 個のコロニーについてコロニーハイブリダイゼーションを行ない、コロニーを選択した。選択したコロニーの個数は全 mRNA からオリゴ dT プライマーを用いて作製した cDNA ライブラリーから 69 個、H鎖 mRNA から合成オリゴマーを用いて作製した cDNA ライブラリーから 28 個であった。

【0043】3) これら選別したコロニーよりラピッドプラスミド単離法によりプラスミドを調製した後、PstI で消化し、1.2 % アガロース電気泳動で切り出される断片の長さを検定し、300 ~ 1200bps の断片を持つクローンを選択した。cDNA ライブラリー①より 28 個、③より 17 個のクローンを選択した。

【0044】4) 次に PstI で切り出される断片のサザンハイブリダイゼーションを行うに当たり、プローブとして使用するために既にクローン化された H鎖の遺伝子が入手出来なかったため、前述の cDNA 作成の際使用した、合成オリゴマー 5'-AGGGTCACCATGGAC (H鎖定常領域の 5' 端付近の配列) の 5' 端に RI ラベルしたものをプローブとして用いた。①より選択した 28 個のうち ~ 900bp 以上の断片を持つクローンについて、③より選択したものについては 16 クローンについてサザンハイブリダイゼーションを行なった結果、いずれもハイブリダイズするものはなかった。

【0045】5) しかし①より得られた ~ 900bps 以上の断片を持つもの 4 クローンについては、用いたプローブの位置 (H鎖定常領域の 5' 端付近、ポリ A 部位から上流 ~ 1000bsp の位置) まで cDNA の合成が行なわれていない可能性もあり、そのうちの 2 クローンについては大スケールでプラスミドを調製し、各種制限酵素による消化を行ない、文献に記載されている定常領域の制限酵素地図と比較したところ、その内の一つのクローン EH-16 の制限酵素地図が文献のそれと一致した (図 4)。

【0046】クローン EH-16 は図 4 より明らかなように H鎖の 3' 末から定常領域の ~ 80% をコードしているにすぎず、5' 側の可変領域をコードする cDNA を持つクローンは得られなかったため、さらに H鎖 cDNA クローンの検索を行なった。

【0047】2-3-3 H鎖 cDNA クローンの再検索と同定

1) ①全 mRNA : オリゴ dT プライマーより作成した cDNA ライブラリーから ~ 10000 個のコロニーについて再度コロニーハイブリダイゼーションを行なった。可変領域をコードする cDNA を持つクローンを得る目的で、先程用いた合成オリゴマー 5'-AGGGTCACCATGGAG (定常領域の 5' 端付近の配列) をプローブとして用いて行なった結果、5 個の強くハイブリダイズするコロニーを選択し

た。

【0048】2) これらコロニーよりラピッドプラスミド単離法によってプラスミドを得、BamHI、PstI およびその他の制限酵素で消化し、アガロース電気泳動により切り出された断片の長さを検定するとともに、BamHI、PstI 断片については先程と同じプローブを用いてサザン*

*ハイブリダイゼーションを行なった。

【0049】下記表3に制限酵素で切り出された断片の長さを示すとともに、プローブとハイブリダイズした断片に下線を付けた。

【0050】

【表3】

制限酵素	クローン				
	HII-1	-2	-3	-4	-5
BamHI	3900bps	3400	3900	4200	3900
	1680	1400	1650	1300	1650
PstI	4360	4360	4360	4360	4360
	450		450	800	450
	380		380	300	380
AccI	3500		3500	3600	3500
	1800		1800	2000	1800
	1700		1700	1800	1700
	890		890	1700	890
HincII				500	
	4360		4360	3400	4360
	1250		1250	1250	1250
				1000	
SmaI	5200		5200	5200	5200

【0051】表3よりクローンHII-1、-3、-5は同じであり、クローニングされた cDNA は定常領域の中ほどより可変領域を持つと思われる。一方クローンHII-4ではプラスミド pBR322 に挿入された cDNA の向きが前者とは逆になっており、可変領域はほとんど含まないと思われる(図5)。pHII3を得、各種制限酵素で消化を行ない、その切断パターン(図3)を文献記載のものと比較した。その結果 pHII3は可変領域のほぼ全域と定常領域の5'側の一部を含むことが明かとなり、その定常領域の制限酵素地図は文献のそれと一致した(図3)。

【0052】以上の結果、次の3クローンが同定され、ここに IgG cDNA の全領域がクローン化された。

・L鎖 cDNA クローン：EL39 ほぼ全領域をクローン化する

・H鎖 cDNA クローン：EH16 定常領域の3'側80%をクローン化する

HII-3 定常領域の5'側50%と可変領域の全域をクローン化する

pBR322にクローニングされた cDNA プラスミドをそれぞれ pEL39、pEH16、pHII3と略す。

【0053】2-4 抗 TMVマウス IgG・cDNA の制限酵素地図および塩基配列

1) DNA 塩基配列決定のための制限酵素地図の作成。

IgG の定常領域は Balb/C マウスの同一クラス IgG (P-

7の場合、クラスは γ 1、L鎖は κ)では同じであるので、定常領域だけをコードする pEH16、および pEL39、pHII3の定常領域については制限酵素による消化と文献記載の配列によって制限酵素地図を作成した。可変領域については、プラスミド pEL39、pHII3をそのまま、あるいはプラスミドより切り出した cDNA を、あるいは cDNA の一部の断片を各種の制限酵素で切断し、アガロース及びポリアクリルアミド電気泳動によってその切断断片の長さを決定し、cDNA上に並べて位置関係を推定して地図を作成した(図3)。

【0054】2) 塩基配列の決定

制限酵素地図を参考に、適当な部位の5'端のリン酸基をRIラベルした DNA断片を調製し、マキサム-ギルバート法により塩基配列を決定した。図3に塩基配列決定の方向と長さを示し、図6及び図7にL鎖、図8～図10にH鎖 cDNA の塩基配列を示した。

【0055】II-3 植物ベクターへ組み込むための IgG・cDNA の調製

遺伝子の植物細胞への導入は完成されたベクター系が必要であり、植物で機能するものとしては現在のところ Ti プラスミドを用いる系が最良である。Ti プラスミド系に組み込むための cDNA の満たすべき条件として、以下の点を想定した。

1) 開始コドン ATGの5'上流非翻訳部分に於いて ATGよ

り上流10~30bps の間にTi系に組み込むための制限酵素リンカーを付加する。一方終止コドンの3'下流非翻訳部分に於いて終止コドンとポリA部位の間にも同じ制限酵素リンカーを付加する。すなわちリンカーとして導入した制限酵素で、調製したcDNAが一つの断片として切り出され、それをそのままTiプラスミド系に組み込むことが出来るよう調製する。

2) L鎖およびH鎖のそれぞれについてリーダー配列を持つものと、リーダー配列を含まない成熟配列だけのcDNAの両者を1)の条件を満たすように調製する。

[IgGはリーダー配列を持って発現されるが、分泌される時点でリーダー配列は切り取られ成熟IgGとして分泌される。]

前出の制限酵素リンカーはL鎖およびH鎖cDNA中に切断部位を持たず、しかもcDNA調製の際に用いるベクター中にクロニング部位以外に切断部位を持たないものとしてBgl IIを選んだ。ベクターは13個の制限酵素部位よりなるMCS(マルチクロニング部位)を持つpUC18を選んだ。ベクターの構築は塩基配列より予想される制限酵素地図を参考にして行なった。以上の各条件を満たして調製されたIgG cDNAを組み込んで構築されるべきcDNAベクターを次のように略記する。

pUCLM - L鎖、成熟L鎖をコードするcDNAをpUC18に組み込んだもの。

pUCLL - L鎖、リーダー配列を含むL鎖をコードするcDNAをpUC18に組み込んだもの。

pUCHM - H鎖、成熟H鎖をコードするcDNAをpUC18に組み込んだもの。

pUCLH - H鎖、リーダー配列を含むH鎖をコードするcDNAをpUC18に組み込んだもの。

【0056】3-1 ベクターpUC18の改変

調製されたcDNAを組み込むためのベクターとしてpUC18(Pharmacia PLより市販)を選んだが、pUC18のMCS(マルチクロニング部位)にはクロニング部位となるべき、さきほどリンカーとして選んだBgl IIの切断*

pUCLPR70 EcoRI-PstI 90bps断片 cDNA 5' 側
pEL39 → PstI-Bgl II 600bps断片 cDNA 3' 側

↓

pUC18BgSma ベクターのマルチクロニング部位中のEco RI-Bgl II

[pUCLM]

【0060】得られたクローンpUCLMについて、接続部位の制限酵素部位(EcoRI, Pst I, Bgl II)および構築の際、新しく出来るNco I部位(5'端のATGの所)、再生されるAva II部位はそれぞれの制限酵素の消化により確認した。また、5'および3'端のDNAシーケンシングにより成熟cDNAの5'および3'端に欠失はなく、最初の条件を満足する位置にBgl II部位を持つことが確認された。

【0061】3-2-2 pUCLL (L鎖リーダー-cDNA)

1) リーダー配列の開始コドンATGの上流30bps以内に

*部位がないので、まずpUC18のMCSにBgl II部位を導入した。

①pUC18 MCSのSacIをBgl IIに置き換えたもの[pUC18BgSac]

②pUC18 MCSのSmaIをBgl IIに置き換えたもの[pUC18BgSma]

以上の二種のベクターを調製した。さらにpUC18とMCSにおける制限酵素の配列が逆になっているpUC9(Pharmacia PLより市販)についても同様に行なった。

③pUC9 MCSのBam HIをBgl IIに置き換えたもの[pUC9BgBam]

図11に各ベクターのMCS部分の配列と制限酵素部位を示す。これらの配列は、後述の構築したcDNAベクターのシーケンシングにより決定した。

【0057】3-2 cDNAベクターの構築

3-2-1 pUCLM (L鎖成熟cDNA)

1) L鎖cDNA 5'側のリーダー配列を取り去って mature sequenceの5'端に開始コドンATGを付加するために、CATGの次に成熟配列5'端15bsを持つ合成オリゴマー19bs CATG-GATATTGTGATGACT(下線の配列が成熟配列の5'端)を用いて、プライマーリペアー(primer repair)法で5'端ATGを調製し、Pst I消化により70bpsの断片として、成熟cDNAの5'先端部分を得た。この70bps断片を、まずpUC18BgSacのSmaI-Pst I部位にクロニングした(pUCLPR70)。

【0058】2) L鎖cDNA 3'側、終止コドンTAGの下流6bpsにAva II部位が有り、ここで切断して、DNAポリメラーゼ1ラージフラグメント(Klenow type)(以後、klenowと略す)で平滑末端とし、Bgl IIリンカーを付加した。その後、Bgl II-Pst Iで切断し600bpsの断片としてL鎖cDNAの3'側を得た。

【0059】3) pUCLPR70よりEco RI-Pst I消化で90bps断片を得、成熟cDNAの5'側とした。これと、

2)で得た600bps 3'側断片を同時にpUC18BgSmaのEco RI-Bgl II部位にクロニングした。

適当な制限酵素部位がないことより、ATGのすぐ後にあるBan I部位を用い、開始コドンATGをNco Iリンカーと結合することにより再生する方法で、リーダー配列の5'端を調製した(図12)。この時、開始コドンATGの次の塩基が、A→Gと代わり、従ってアミノ酸もArgからGlyへATG-AGG(Arg)→ATG-GGG(Gly)と変化する。

【0062】2) このようにして得たNco I-Ava I 380bps断片を、3-2-1で調製したpUCLMのNco I-Ava I部位に導入することによりリーダー配列cDNAをクローニ

ングした。[pUCLL]

従って、pUCLLにおけるcDNAの5'上流および3'近辺の配列はpUCLMと全く同じになるはずである。cDNA 5'端付近の塩基配列はシーケンシングによって確認した。なお、pUCLLを含む大腸菌は工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、その受託番号はFERM BP-4265である。

【0063】3-2-2 pUCHM (H鎖成熟cDNA)

1) 3'端の調製:pEH16により、終止コドンTGAの下流25bpsの所にあるAvalI部位を利用し、前述の様にBgl IIリンカーを付加し、SmaI-Bgl IIで消化して490bpsの断片として3'端部分を得て、これをpUC9BgBamのBgl II-SmaI部位にクローニングした。[pUCH6]

【0064】2) H鎖、全長cDNAの調製:pHI13より、cDNA 5'端に隣接するpBR322上のMstI部位とcDNAのSmaI部位間のMstI-SmaI断片1000bpsを切り出し、1)で得たpUCH6のSmaI部位に導入した。[pUCH10]

得られたプラスミドpUCH10は5'端にpBR322の配列の一部を持ち、3'端は終止コドンの25bps下流にBgl II部位を持つ全長のcDNAをクローニングしている。

【0065】3) pUC18への再クローニング:まず開始コドンATGを含むpHI13のHinfI断片330bpsをpUC18BgSmaのHinc II部位にクローニングした。[pUCH12]

次いで、このpUCH12のTth1111-Hind III部位に、2)で得たpUCH10のTth1111-Hind IIIの断片1230bpsを導入した。[pUCH16]

pUCH16はcDNAの非翻訳部分を除いたコード領域の全長をもち、開始コドンATGの上流および終止コドンTGAの下流にBgl II部位を持つが、ATGとBgl IIとの距離が30bpsあり、またベクターとcDNAの5'側接続部分に制限酵素部位を持たない。

【0066】4) 5'端の調製:cDNA 5'側のリーダー配列を取り去り、成熟配列の5'端に開始コドンATGを付加するために、L鎖の場合と同様に、合成オリゴマー19bs CATG-CAGGTTCCAGTCCAG (下線の部分がH鎖cDNA成熟配列の5'端)を用いて、プライマーリペアー法によって5'端ATGを調製し、Tth1111で切断することによって、130bpsの断片として5'先端部分を得た。これを、3)で得たpUCH16のXbaI (klenowで平滑末端化してある)-Tth1111部位に導入して、成熟配列をコードするH鎖cDNAを得た。[pUCHM]

【0067】3-2-4 pUCLH (H鎖リーダーcDNA)

1) 5'端の調製:pHI13より、pBR322上のMstI部位およびcDNA上のSmaI部位で切り出したMstI-SmaI断片1000bpsをpUC18BgSacのSmaI部位にクローニングし、cDNAの5'側を得る。[pUCH11]

pUCH11のBgl III-Tth1111部位へ、pHI13 cDNAの5'端付

近の開始コドンATGを含むHinfI 330bps断片にBgl IIリンカーを付加したものを、Bgl II-Th1111で消化して得た190bps断片を導入して、5'非翻訳部分を除いた、開始コドンの上流10bpsにBgl II部位を持つ、pUCH13を得た。(ベクターとcDNA 5'側接続点はHinfI部位が再生する。)[pUCH13]

【0068】2) 全長cDNAの調製:pUCHMの2)で得たpUCH10より、3'側NcoI-Hind III 940bpsおよび3'非翻訳部分を除いた、開始コドンの上流および終止コドンの下流にBgl II部位を持つ、全長cDNAをクローニングしたpUCLHを得た。なお、pUCLHを含む大腸菌は工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、その受託番号はFERM BP-4266である。

【0069】3-3 構築ベクターの塩基配列の確認 構築した4種のベクターpUCLM, pUCLL, pUCHM, pUCLHに於けるpUC18とcDNAのBgl II部位を含む5'および3'側の結合部分の塩基配列をマキサム・ギルバート法によって決定した。いずれの場合も計画した塩基配列の存在を確認した(図13)。ここに、植物ベクターに組み込むための条件を満たしたcDNAの調製を完了した。

【0070】TMV抗体遺伝子

プラスミドpUC18にクローニングされた4種(LL: L鎖、リーダー配列あり、LM: L鎖、リーダー配列なし、HL: H鎖、リーダー配列あり、HM: H鎖、リーダー配列なし)の抗体遺伝子を制限酵素Bgl IIにより単離を行った。

【0071】植物発現用ベクターへのTMV抗体遺伝子の導入

植物発現用ベクターとしてpGA643を用いた。このベクターは、カナマイシン耐性遺伝子、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター、マルチクローニングサイト、T-DNAの左右のボーダーを有するバイナリー発現ベクターである。上述した4個(LL, LM, HL, HM)の遺伝子をそれぞれpGA643のBgl IIサイトへ組み込んだあと(図14)、作製したH鎖遺伝子を有するpGA643とL鎖遺伝子を有するpGA643を用いて、L鎖遺伝子とH鎖遺伝子を同一のベクターに導入する方法をとった。H鎖遺伝子ベクターを制限酵素EcoRIおよびAsu IIで切断し、35SプロモーターおよびH鎖遺伝子を含むDNA断片を得たのち、Asu IIサイトを大腸菌DNAポリメラースクレノー断片により平滑末端とした後、EcoRIリンカーを接続しL鎖遺伝子ベクターのEcoRIサイトへ組み込んだ(図15)。以上のように構築して得られたH鎖、L鎖の両遺伝子が連結されたベクターを凍結法によりアグロバクテリウム・ツメファシエンシスの菌系種LBA4404(ホックマンら、Nature 303:179-180, 1983)に導入した。

【0072】植物材料および形質転換

抗体遺伝子を導入するタバコ品種として、TMV罹病性品種BY4、および、過敏感型抵抗性を有するF104を用い

た。温室より採取したタバコの葉をエチルアルコールおよび次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌した後、直径約 6 mm の葉片ディスクを調製した。この葉片と H 鎖、L 鎖の両遺伝子が連結されたベクターを導入したアグロバクテリウム・ツメファシエンシス LBA4404 約 10^8 個の細胞とを Linsmaier and Skoog の無機塩類と 30 g/l のショ糖より成る液体培地中で 48 時間共存培養を行った。その後、葉片を滅菌水で洗浄し細菌を洗い落とした後、Linsmaier and Skoog の無機塩類、インドール酢酸 0.3 mg/l、6- γ - γ -ジメチルアリルアミノ) プリン 10 mg/l、カナマイシン 200 mg/l、セフトキシム 250 mg/l および寒天 0.9% を含む莖葉分化培地に置床し、約 1 カ月後、カナマイシン耐性を示す莖葉を Linsmaier and Skoog の無機塩類、30 g/l のショ糖およびセフトキシム 250 mg/l および寒天 0.9% を含む発根培地に置床した。培養約 1 カ月後、発根した植物体を閉鎖系温室内で栽培した。

【0073】ノーザン分析による TMV 抗体遺伝子の mRNA 転写の確認

形質転換体の葉より全 RNA を抽出し、グリオキサールおよび DMSO で変性させた後、アガロースゲル電気泳動により分離した。つぎに、RNA をナイロン膜に移行させ、HM 遺伝子 1.4 kb、LM 遺伝子 0.7 kb それぞれをランダムプライム法により 32 P で標識したプローブを用いてノーザン分析を行った。LM 遺伝子をプローブとして用いたとき、すべての形質転換体において 1.0 kb の mRNA の転写が認められ、これは予測される L 鎖遺伝子から転写される mRNA の大きさと一致した。またコントロールとして用いたタバコにはこの様な mRNA の転写は認められなかった。一方、HM 遺伝子をプローブとして用いたとき、全ての形質転換体において 1.7 kb の mRNA の転写が認められ、予測される H 鎖遺伝子から転写される mRNA の大きさと一致した。また、コントロールとして用いたタバコにはこの様な mRNA の転写は認められなかった。以上の結果からリーダー配列の有無に関係なく全ての形質転換体において、両鎖遺伝子の mRNA が転写されていることが明らかになった。

【0074】ウエスタン分析による H 鎖、L 鎖タンパク質の会合の確認

ノーザン分析において mRNA の転写が確認された個体についてウエスタン分析を行なった。再分化植物体の葉より全タンパク質を抽出し、4 M 尿素、1% SDS、および 2 mM DTT 溶液中で煮沸を行ない変性させた後、SDS-PAGE により分離した。つぎに、セミドライブロッティングによりタンパク質をニトロセルロース膜に移行させ、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗マウス IgG を用いて分析を行った。その結果、リーダー配列を有する形質転換体はコントロールのマウスの IgG 同様、H 鎖、L 鎖のバンドが認められ、両鎖のタンパク質を生成していることが明らかになった。一方、リーダー配列を欠く形質転換

体においてはこのようなバンドは認められず、これらの個体においては両鎖のタンパク質は生成されていないものと考えられた。またコントロールとして用いたタバコにもこの様なタンパク質の生成は認められなかった。以降の実験ではリーダー配列を含む形質転換体を供試した。

【0075】Protein A による TMV 抗体の精製およびウエスタン分析による H 鎖、L 鎖会合の確認

Protein A は免疫グロブリン G (IgG) の H 鎖、Fc 部位に特異的に結合し、各種モノクローナル抗体の精製に利用されている。この特異結合性を利用して Protein A によるタンパク質の精製を行い H 鎖、L 鎖が植物体内で抗体分子として会合しているかどうかを検討した。まずタンパク質を Protein A により精製し次に、この精製したタンパク質の変性を行い、上述した方法を用いてウエスタン分析を行った。抗体分子として会合しているならば、ウエスタン分析を行なった際、両鎖のバンドが検出されるが、会合していない場合は H 鎖のみのバンドが検出されるものと考えられる。供試した形質転換体当分の全ての個体で、発現量の差は認められるものの、対照のマウス IgG と同様な H 鎖と L 鎖のバンドが検出された。この結果、形質転換体で生成された両鎖が抗体分子として会合していることが明らかとなった。次に、生成されている抗体の発現量について調査を行った。デンシトメーターで測定した結果、発現量の高い個体では葉の全可溶性タンパク質の 0.8%、低い個体では 0.2% が本抗体に相当することが確認された。

【0076】ELISA 法による植物体で生成された TMV 抗体と抗原である TMV との結合調査

ELISA 法によって抗体と抗原の結合の調査を行った。この手法はモノクローナル抗体のスクリーニングに用いられる固相抗体結合分析 (SABA) 法を応用したものである。TMV あるいは TMV のコートプロテインをマイクロプレートに吸着させ 3% BSA 含有 PBST を加えブロック処理を行った後、形質転換体の粗抽出液と反応させた。3% BSA 含有 PBST で洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識マウス IgG と反応させ、基質を加え発色および吸光値の調査を行った。抗体分子と抗原が結合しているならば抗原、抗体および標識抗体が結合し発色が認められるが、結合していない場合は抗体および標識抗体の結合のみしか起こらず、洗浄により除去されるための発色は認められないことになる。TMV のコートプロテインを単離精製し、TMV 粒子とともに抗原とした。吸着させた抗原と形質転換体自殖 1 代目 BY 4 系、F104 系の粗抽出液を反応させ、アルカリフォスファターゼ標識マウス IgG を加えた。上記の実験はいずれも低温室内で行った。その結果を自殖 1 代目のウエスタン分析結果とともに表 4、5 に示した。抗原として TMV 粒子とコートプロテインのどちらを用いた場合も、供試した全ての形質転換体において発色が認められ、対照として用いた BY 4 および F104 において発色が認められなかったことから、形質転換

体で生成された抗体が抗原と結合することが明らかとなった。また、形質転換体の個々の吸光値の差はウエスタン分析による発現量の高低とほぼ対応していた。 * 【0077】

【表4】

抗体と抗原との結合試験 (BY4系)

形質転換体	ウエスタン分析 (自殖1代目)	発色度	吸光度
TBL110	++	++	1.5
TBL120	++	++	1.5
TBL140	++	++	1.3
TBL150	+++	+++	2.5
TBL160	++	++	1.6
TBL170	+++	+++	2.2
TBL180	+	+	0.7
TBL190	+++	+++	2.1
TBL200	+	+	0.6
BY4	-	-	0.02

+++：高い、++：中程度、+：低い、-：発現、発色無し ※ 【0078】
【表5】

*：測定値はOD₄₀₅ の吸収を示している。 ※
抗体と抗原との結合試験 (F104系)

形質転換体	ウエスタン分析 (自殖1代目)	発色度	吸光度
TFL110	+	+	0.7
TFL120	++	++	1.6
TFL130	+	+	0.4
TFL140	++	++	1.6
TFL150	+++	+++	2.2
TFL160	+++	+++	2.4
TFL170	++	++	1.8
TFL180	++	++	1.5
TFL190	+++	+++	2.6
TFL200	+++	+++	2.3
F104	-	-	

+++：高い、++：中程度、+：低い、-：発現、発光無し

*：測定値はOD₄₀₅ の吸収を示している。

【0079】

【発明の効果】本発明により、実用価値の高い、ウイルスを抗原とする動物由来のモノクローナル抗体を産生する植物体が初めて提供された。本発明により、分子農業（バイオファーム）を行えば、生産コストのかからない医薬、動物用薬、診断薬用等の抗ウイルス抗体を大量に

得ることができると考えられる。また、本発明により、ウイルス耐病性植物を得ることも可能である。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：961

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

24

[illegible]

25

26

CTACCACTGT TGCGGTGCTC CAAACCTCCT CCCACCTCC TTCTCCTCCT CCTCCCTTTC 900
 CTTGGCTTTT ATCATGCTAA TATTTGCAGA AAATATTCAA TAAAGTGAGT CTTTGCACTT 960
 G 961

配列番号：2

配列の長さ：1 5 5 3

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

GGACCGCATA TGATCAGTAA CCTCTTCACA GTCAGTAAAA AACTGACTC TAATC ATG 58
 Met
 GAA TGT AAC TGG ATA CTT CCT TTT ATT CTG TCA GTA ACT TCA GGT GTC 106
 Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly Val
 -15 -10 -5
 TAC TCA CAG GTT CAG CTC CAG CAG TCT GGG GCT GAG CTG GCA AGA CCT 154
 Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro
 -1 1 5 10
 GGG GCT TCA GTG AAG TTG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT 202
 Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 15 20 25 30
 AGC TAC TGG ATG CAG TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA 250
 Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 35 40 45
 TGG ATT GGG GCT ATT TAT CCT GGA AAT GGT GAT ACT AGG TAC ACT CAG 298
 Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln
 50 55 60
 AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAT AAA TCC TCC AGC ACA 346
 Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr
 65 70 75
 GCC TAC ATG CAA CTC AGC GCC TTG GCA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT 394
 Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ala Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 80 85 90
 TAC TGT GCA AGA GAG GGG GGT TAC TCC TGG TCC GAC TAT GCT ATG GAC 442
 Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Gly Tyr Ser Trp Ser Asp Tyr Ala Met Asp
 95 100 105 110
 TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA GCC AAA ACG ACA 490
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
 115 120 125
 CCC CCA TCT GTC TAT CCA CTG GCC CCT GGA TCT GCT GCC CAA ACT AAC 538
 Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn
 130 135 140
 TCC ATG GTG ACC CTG GGA TGC CTG GTC AAG GGC TAT TTC CCT GAG CCA 586
 Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155
 GTG ACA GTG ACC TGG AAC TCT GGA TCC CTG TCC AGC GGT GTG CAC ACC 634
 Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr
 160 165 170
 TTC CCA GCT GTC CTG CAG TCT GAC CTC TAC ACT CTG AGC AGC TCA GTG 682
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val
 175 180 185 190
 ACT GTC CCC TCC AGC CCT CGG CCC AGC GAG ACC GTC ACC TGC AAC GTT 730
 Thr Val Pro Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val

である。

- 15 -

方法を示す図である。

【図3】実施例で作製されたL鎖cDNAクローン及びH鎖cDNAクローンの制限酵素地図である。

【図4】実施例で作製されたH鎖cDNAクローンの制限酵素地図及び文献に示されたH鎖cDNAの制限酵素地図である。

【図5】実施例で作製されたH鎖cDNAクローンの制限酵素地図である。

【図6】実施例で得られたL鎖cDNAの塩基配列とそれによってコードされるアミノ酸配列を示す図である。 10

【図7】図6に示す配列の続きを示す図である。

【図8】実施例で得られたH鎖cDNAの塩基配列とそれによってコードされるアミノ酸配列を示す図である。

【図9】図8に示す配列の続きを示す図である。

【図10】図9に示す配列の続きを示す図である。

【図11】実施例で用いた各ベクターのマルチクローニング部分の制限酵素部位を示す図である。

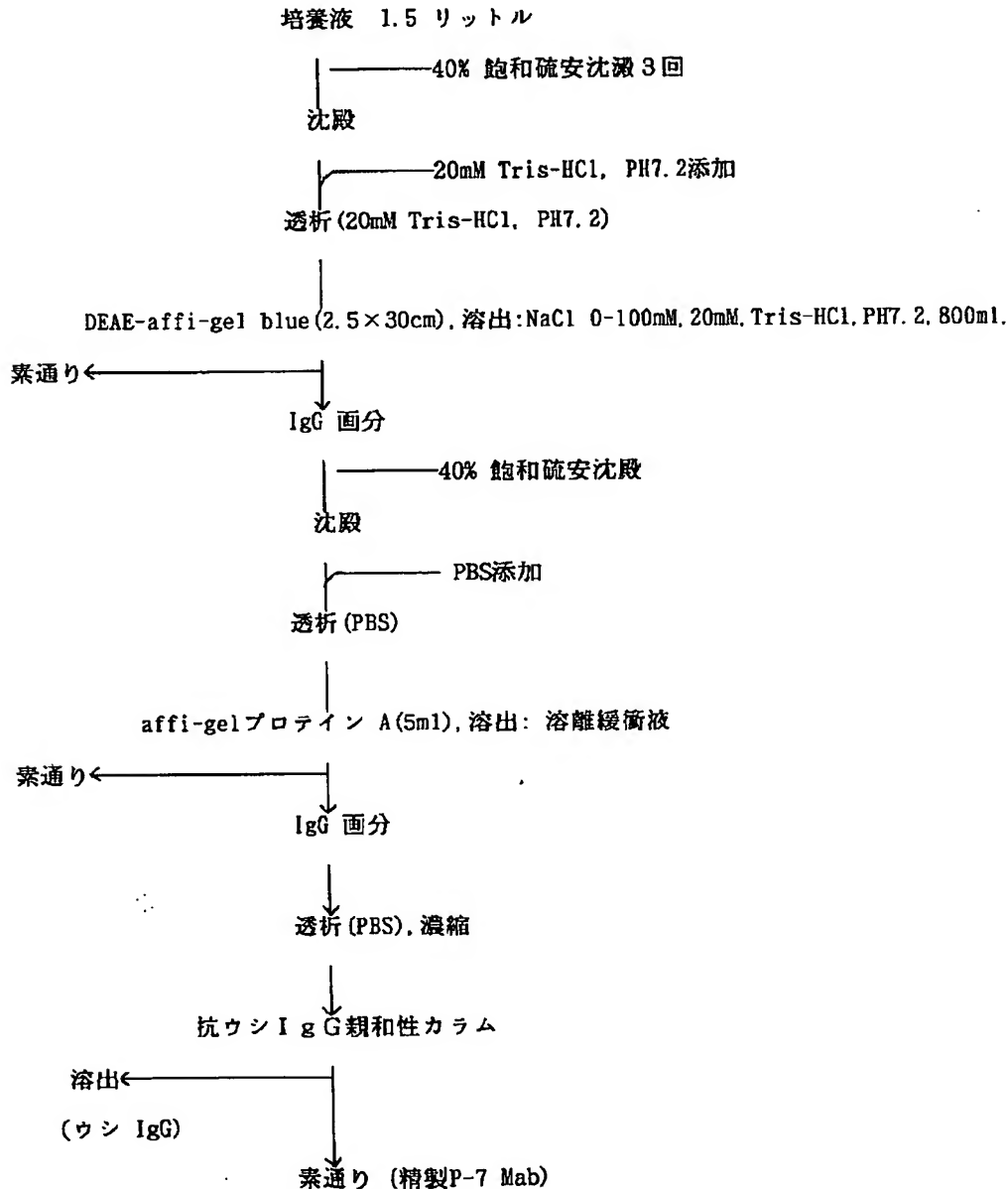
【図12】実施例で作製した、L鎖リーダー配列含有cDNAの作製方法を示す図である。

【図13】実施例で作製した各組換えベクターの部分的塩基配列を示す図である。

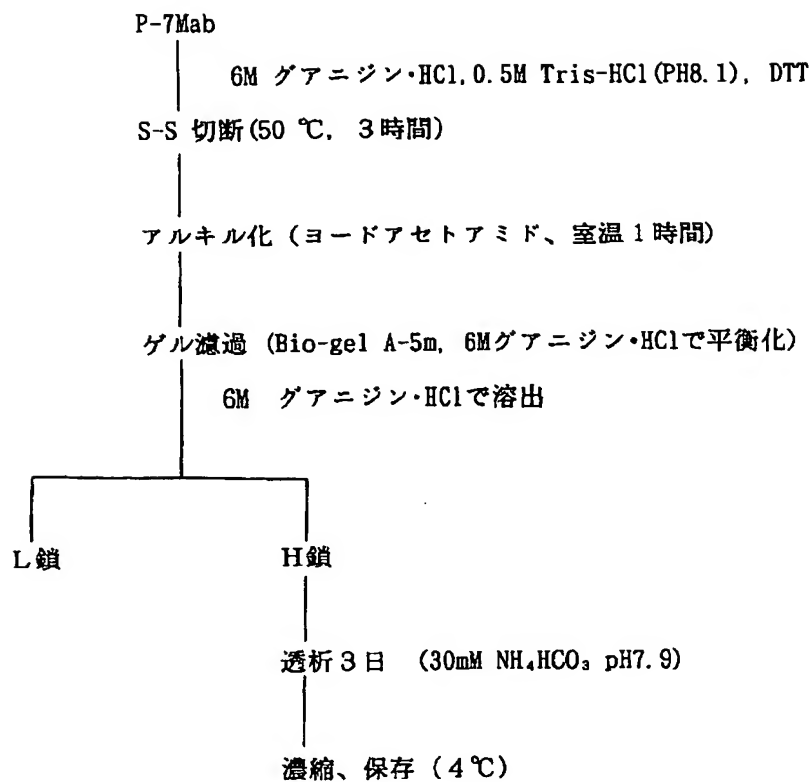
【図14】L鎖cDNA又はH鎖cDNAをTiプラスミドベクターであるpGA643に組み入れた組換えベクターの遺伝子地図である。

【図15】L鎖遺伝子及びH鎖遺伝子を連結したベクターの構築方法を示す図である。

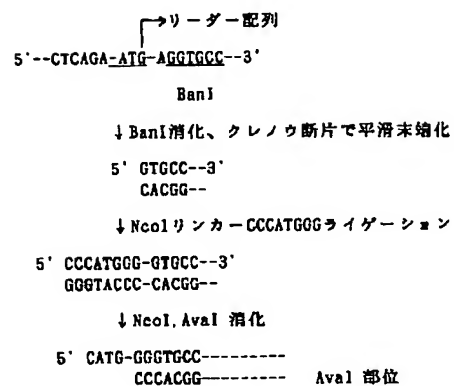
【図1】



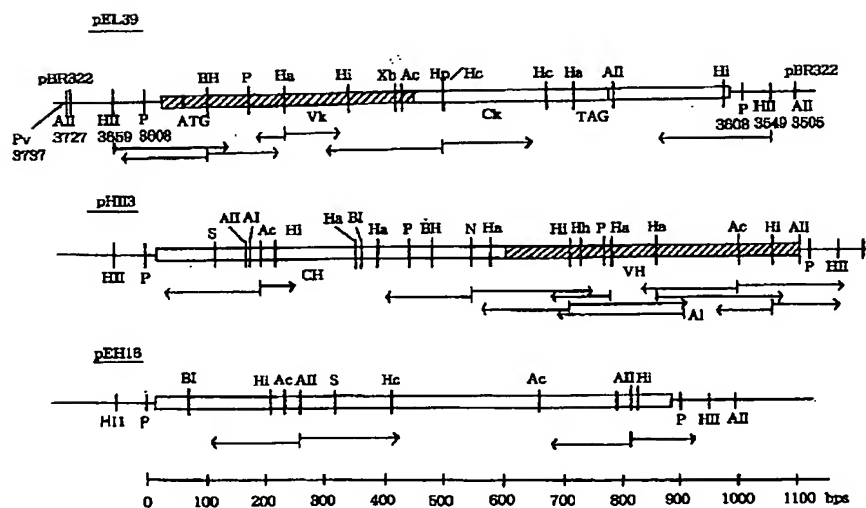
【図2】



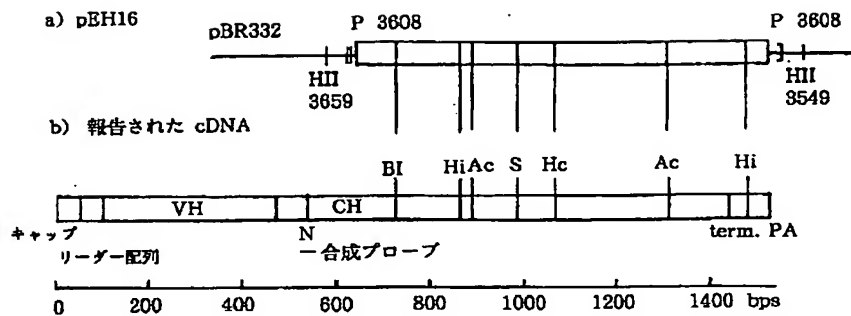
【図12】



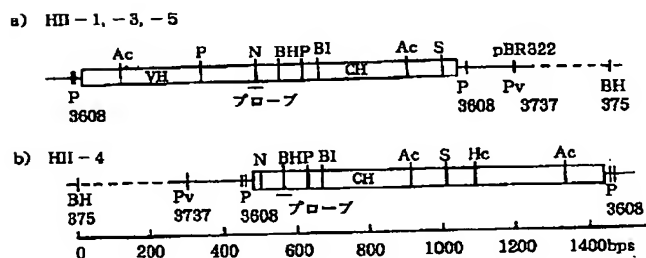
【図3】



【図4】



【図5】



【図11】

pUC18 ::: 5'GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTG 3'

EcoRI SacI KpnI SmaI BamHI XbaI SalI PstI SphI Hind

pUC18BgSac::GAATTCAGATCTGCGGTACCCGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTG

EcoRI BglII KpnI SmaI BamHI XbaI SalI PstI SphI Hind

pUC18BgSma::GAATTCGAGCTCGGTACCCAGATCTGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTG

EcoRI SacI KpnI BglII BamHI XbaI SalI PstI SphI Hind

pUC9 :::::AAGCTTGGCTGCAGGTCGACGGATCCCCGGGAATTC

Hind PstI SalI BamHI SmaI EcoRI

pUC9BgBam::AAGCTTGGCTGCAGGTCGACGGATCAGATCTGATCCCCGGGAATTC

Hind PstI SalI BglII SmaI EcoRI

【図 6】

10 20 30 40 50 60
 ACTACTCAAGACTTTTGTATCAAGTTCTCAGAATGAGGTGCCTAGCTGAGTTCCTGGGG
 MetArgCysLeuAlaGluPheLeuGly

70 80 90 100 110 120
 CTGCTTGTGCTCTGGATCCTTGGAGCCATTGGGATATTGTGATGACTCAGGCTGCACCC
 LeuLeuValLeuTrpIleLeuGlyAlaIleGlyAspIleValMetThrGlnAlaAlaPro
 リーダー配列 ← | → 成熟

130 140 150 160 170 180
 TCTATACCTGTCACTCTTGGAGAGTCAGTATCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTC
 SerIleProValThrLeuGlyGluSerValSerIleSerCysArgSerSerLysSerLeu

190 200 210 220 230 240
 CTGCATAGTAATGGCAACGCTTTCTTGATTGGTTCCTACAGAGGCTAGGCCAGTCTCCT
 LeuHisSerAsnGlyAsnAlaPheLeuTyrTrpPheLeuGlnArgLeuGlyGlnSerPro

250 260 270 280 290 300
 CAGCTCCTGATATATCGGATATCCAACCTGCCTCAGGTAGTCCAGACAGGTTCAAGTGGC
 GlnLeuLeuIleTyrArgIleSerAsnProAlaSerGlySerProAspArgPheSerGly

310 320 330 340 350 360
 AGTGGGTGAGGAAGTCTTTCACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGT
 SerGlySerGlyThrAlaPheThrLeuArgIleSerArgValGluAlaGluAspValGly

370 380 390 400 410 420
 GTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCTTTCACGTTGACTCGGGGACAAAGTTG
 ValTyrTyrCysMetGlnHisLeuGluTyrProPheThrPheAspSerGlyThrLysLeu

430 440 450 460 470 480
 GAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAG
 GluIleLysArgAlaAspAlaAlaProThrValSerIlePheProProSerSerGluGln
 → CK

490 500 510 520 530 540
 TTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATC
 LeuThrSerGlyGlyAlaSerValValCysPheLeuAsnAsnPheTyrProLysAspIle

【図 7】

550 560 570 580 590 600
AATGTCAAGTGGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACT
AsnValLysTrpLysIleAspGlySerGluArgGlnAsnGlyValLeuAsnSerTrpThr

610 620 630 640 650 660
GATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGAC
AspGlnAspSerLysAspSerThrTyrSerMetSerSerThrLeuThrLeuThrLysAsp

670 680 690 700 710 720
GAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCC
GluTyrGluArgHisAsnSerTyrThrCysGluAlaThrHisLysThrSerThrSerPro

730 740 750 760 770 780
ATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTAGAGACAAAGGTCCTGAGACGCCACCACC
IleValLysSerPheAsnArgAsnGluCys***

790 800 810 820 830 840
AGCTCCCCAGCTCCATCCTATCTTCCCTTCTAAGGTCTTGGAGGCTTCCCCACAAGCGAC

850 860 870 880 890 900
CTACCACTGTTGCGGTGCTCCAAACCTCCTCCCCACCTCCTTCTCCTCCTCCTCCCTTTC

910 920 930 940 950 960
CTTGGCTTTTATCATGCTAATATTTGCAGAAAATATTCAATAAAGTGAGTCTTTGCACTT
G

【図8】

10 20 30 40 50 60
 GGACCGCATATGATCAGTAACCTCTTCACAGTCACTGAAAACACTGACTCTAATCATGGA
 MetGlu

70 80 90 100 110 120
 ATGTAAGTGGATACTTCCTTTTATTCTGTCTAGTAAGTTCAGGTGTCTACTCAGGTTCA
 CysAsnTrpIleLeuProPheIleLeuSerValThrSerGlyValTyrSerGlnValGln
 リーダー配列 ← → 成熟

130 140 150 160 170 180
 GCTCCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGCAAGACCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGTCCTGCAA
 LeuGlnGlnSerGlyAlaGluLeuAlaArgProGlyAlaSerValLysLeuSerCysLys

190 200 210 220 230 240
 GGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGCTACTGGATGCAGTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACA
 AlaSerGlyTyrThrPheThrSerTyrTrpMetGlnTrpValLysGlnArgProGlyGln

250 260 270 280 290 300
 GGGTCTGGAATGGATTGGGGCTATTTATCCTGGAAATGGTGATACTAGGTACACTCAGAA
 GlyLeuGluTrpIleGlyAlaIleTyrProGlyAsnGlyAspThrArgTyrThrGlnLys

310 320 330 340 350 360
 GTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGATAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACT
 PheLysGlyLysAlaThrLeuThrAlaAspLysSerSerSerThrAlaTyrMetGlnLeu

370 380 390 400 410 420
 CAGCGCCTTGGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGAGGGGGTTACTC
 SerAlaLeuAlaSerGluAspSerAlaValTyrTyrCysAlaArgGluGlyGlyTyrSer

430 440 450 460 470 480
 CTGGTCCGACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCAGC
 TrpSerAspTyrAlaMetAspTyrTrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSerAla
 VH, D ← → JH4 ← →

【図 9】

490 500 510 520 530 540
 CAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAACTC
 LysThrThrProProSerValTyrProLeuAlaProGlySerAlaAlaGlnThrAsnSer
 → CH

550 560 570 580 590 600
 CATGGTGACCCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTOACCTG
 MetValThrLeuGlyCysLeuValLysGlyTyrPheProGluProValThrValThrTrp

610 620 630 640 650 660
 GAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCT
 AsnSerGlySerLeuSerSerGlyValHisThrPheProAlaValLeuGlnSerAspLeu

670 680 690 700 710 720
 CTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCCCTCGGCCCAGCGAGACCGTCAC
 TyrThrLeuSerSerSerValThrValProSerSerProArgProSerGluThrValThr

730 740 750 760 770 780
 CTGCAACGTTGCCCACCCGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGA
 CysAsnValAlaHisProAlaSerSerThrLysValAspLysLysIleValProArgAsp

790 800 810 820 830 840
 TTGTGGTTGTAAGCCTTGTCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCC
 CysGlyCysLysProCysIleCysThrValProGluValSerSerValPheIlePhePro

850 860 870 880 890 900
 CCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTGTGGT
 ProLysProLysAspValLeuThrIleThrLeuThrProLysValThrCysValValVal

910 920 930 940 950 960
 AGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTGTAGATGATGTGGAGGT
 AspIleSerLysAspAspProGluValGlnPheSerTrpPheValAspAspValGluVal

970 980 990 1000 1010 1020
 GCACACAGCTCAGACGCAACCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTCCGCTCAGTCAG
 HisThrAlaGlnThrGlnProArgGluGluGlnPheAsnSerThrPheArgSerValSer

【図10】

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 TGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAA
 GluLeuProIleMetHisGlnAspTrpLeuAsnGlyLysGluPheLysCysArgValAsn

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 CAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAA
 SerAlaAlaPheProAlaProIleGluLysThrIleSerLysThrLysGlyArgProLys

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAG
 AlaProGlnValTyrThrIleProProProLysGluGlnMetAlaLysAspLysValSer

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 TCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAA
 LeuThrCysMetIleThrAspPhePheProGluAspIleThrValGluTrpGlnTrpAsn

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 TGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACTCAGCCCATCATGAACACGAATGGCTCTTA
 GlyGlnProAlaGluAsnTyrLysAsnThrGlnProIleMetAsnThrAsnGlySerTyr

1330 1340 1350 1360 1370 1380
 CTTGCTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTTAC
 PheValTyrSerLysLeuAsnValGlnLysSerAsnTrpGluAlaGlyAsnThrPheThr

1390 1400 1410 1420 1430 1440
 CTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTC
 CysSerValLeuHisGluGlyLeuHisAsnHisHisThrGluLysSerLeuSerHisSer

1450 1460 1470 1480 1490 1500
 TCCTGGTAAATGATCCAGTGTCTTGGAGCCCTCTGGTCCTACAGGACTCTGACACCTA
 ProGlyLys***

1510 1520 1530 1540 1550
 CCTCCACCCCTCCCTGTATAAATAAAGCACCCAGCACTGCCTTGGGACCCTGC

【図13】

MCS 配列

(-lacZ' プロモーター----MCS---lacZ'-)

(1) pUCLM L鎖成熟配列

-GAATTCAGATCTGCGGTACCCCATGGATATTGTGA-----TAGAGACAAAGGTCC

BcoRI BglII KpnI NcoI cDNA 680 bps AvalI

AGATCTGGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGC-

BglII BamHI XbaI AccI PstI SphI HindIII

(2) pUCLL L鎖リーダー配列

-CAATTCAGATCTGCGGTACCCCATGGGGTGCCTAG-----TAGAGACAAAGGTCC

EcoRI BglII KpnI NcoI BanI cDNA 740 bps AvalI

AGATCTGGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGC-

BglII BamHI XbaI AccI PstI SphI HindIII

(3) pUCHM H鎖成熟配列

-GAATTCGAGCTCGGTACCCAGATCTGGGGGATCCTCTAGCATGCAGGTCAGC-----

EcoRI SacI KpnI BglII BamHI SphI cDNA 1400 bps

TGATCCAGTGTCCTTGGAGCCCTCTGGTCCAGATCTGCAGATCTGATCCGTCGACCTGCAGCCAAGCTTGGC-

AvaII BglII BglII AccI PstI HindIII

PstI

(4) pUCLH H鎖リーダー配列

-GAATTCAGATCTGACTCTAATCATGGAATGTAAC-----TGATCCAGTGTCCTTGGAGCCCTCTGGTCC

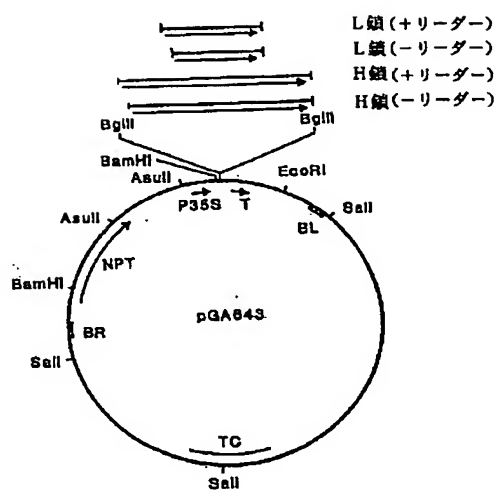
EcoRI BglII HinfI cDNA 1440 bps AvalI

AGATCTGCAGATCTGATCCGTCGACCTGCAGCCAAGCTTGGC-

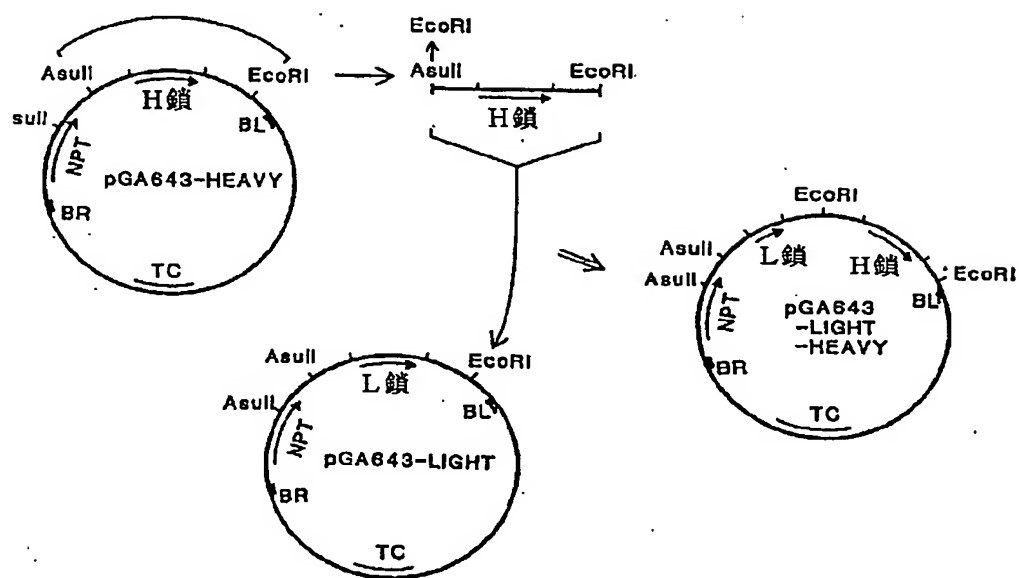
BglII BglII AccI PstI HindIII

PstI

【図14】



【図15】



【手続補正書】

【提出日】平成5年6月21日

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の名称

【補正方法】変更

【補正内容】

【発明の名称】 抗ウイルス抗体を産生する植物及びその作出方法

フロントページの続き

(72)発明者 神代 隆
静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ
産業株式会社遺伝育種研究所内
(72)発明者 村藤 仁昭
大阪府大阪市北区梅田1-12-39 株式会
社クラレ内

(72)発明者 高見 正明
大阪府大阪市北区梅田1-12-39 株式会
社クラレ内
(72)発明者 文野 正恭
大阪府大阪市北区梅田1-12-39 株式会
社クラレ内